



MARIA BEATRIZ FREITAS D'ARCE

**“EFFECTIVENESS OF BLEACHING AGENTS
AT DIFFERENT TEMPERATURES ON ENAMEL AND
DENTIN”**

**“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES
CLAREADORES EM DIFERENTES TEMPERATURAS NO
ESMALTE E DENTINA”**

PIRACICABA

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARIA BEATRIZ FREITAS D'ARCE

**“EFFECTIVENESS OF BLEACHING AGENTS
AT DIFFERENT TEMPERATURES ON ENAMEL AND
DENTIN”**

Orientadora: Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima.

**“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES
CLAREADORES EM DIFERENTES TEMPERATURAS NO
ESMALTE E DENTINA”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica
com área de concentração em Dentística.

Doctorate thesis presented to the Clinical Dentistry Post-Graduate
Program of Piracicaba Dental School of University of Campinas to obtain the Ph.D.
grade in Clinical Dentistry with major in Operative Dentistry.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MARIA BEATRIZ FREITAS D'ARCE E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. DÉBORA
ALVES NUNES LEITE LIMA.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2013

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

D243a D'Arce, Maria Beatriz Freitas, 1976-
Avaliação da eficácia de agentes clareadores em diferentes temperaturas no esmalte e dentina / Maria Beatriz Freitas D'Arce. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Débora Alves Nunes Leite Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Clareamento dental. 2. Efeito da temperatura. 3. Peróxidos. I. Lima, Débora Alves Nunes Leite, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effectiveness of bleaching agents at different temperatures on enamel and dentin.

Palavras-chave em inglês:

Tooth bleaching

Temperature effect

Peroxides

Área de concentração: Dentística

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Débora Alves Nunes Leite Lima [Orientador]

Vanessa Castro Pestana da Silveira Bueno

Marcos Augusto do Rego

José Roberto Lovadino

Flávio Henrique Baggio Aguiar

Data de defesa: 05-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 05 de Julho de 2013, considerou a candidata MARIA BEATRIZ FREITAS D'ARCE aprovada.

Profa. Dra. DEBORA ALVES NUNES LEITE LIMA

Profa. Dra. VANESSA CASTRO PESTANA DA SILVEIRA BUENO

Prof. Dr. MARCOS AUGUSTO DO REGO

Prof. Dr. JOSE ROBERTO LOVADINO

Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE BAGGIO AGUIAR

DEDICATÓRIA

À Deus por me dar saúde e força para realizar este sonho. Obrigada Senhor, pelas oportunidades concedidas e por colocar pessoas tão especiais em meu caminho!

Ao meu pai, Belmiro José (in memorian), que sempre se orgulhou das conquistas dos seus filhos. E agora não seria diferente...Compartilho com você mais esta vitória! Muitas saudades e meu amor eterno!

À minha mãe, Maria Celia, pela parceria de uma vida toda! Pelo incentivo ao crescimento dos seus filhos, nos dando todas as oportunidades que estavam ao seu alcance. Agradeço muito pelo seu apoio, sem ele nada disto seria possível! Meu amor por você sempre será imenso!

Aos meus irmãos José Ricardo, Regina e Beto pela torcida de sempre! Vocês são meus melhores amigos, meus amores, minha vida! Agradeço sempre à Deus por nos encontrarmos nesta vida...

Aos meus sobrinhos: Natália, Tiago, Manuela, Felipe e Catarina. Vocês são minha renovação diária de amor e o grande incentivo para que eu me torne uma pessoa melhor. Amor maior que este eu não conheço!

Aos meus cunhados Rosângela, Edilaine e Gabriel. Obrigada pelo carinho e amizade...Sei que torcem pelo meu sucesso, assim como eu torço muito pela felicidade e prosperidade de vocês!

Aos meus tios (as) e primos (as) queridos (as), mas principalmente à Lídia, Carlos e Isabela d'Arce Martins, tio Raul (in memorian) e tia Marisa d'Arce, por me acolherem com tanto carinho e generosidade em Piracicaba.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima, por me orientar neste trabalho e pela parceria firmada há alguns anos. Agradeço sua confiança, e acima de tudo sua generosidade em dividir comigo suas experiências de vida, sendo um exemplo de profissional para mim. Agradeço por toda paciência e apoio nesta jornada....Que Deus lhe proteja e ilumine sempre! Para você, meu carinho, amizade, respeito e gratidão!

Ao querido Prof. Dr. José Roberto Lovadino, meu orientador durante o estágio e mestrado, por me dar a primeira oportunidade na pós-graduação, e assim tornar possível a realização deste sonho. Agradeço por todo o aprendizado e a confiança em mim depositada!

Ao senhor, minha gratidão eterna!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior e ao diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

À Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia e ao Coordenador associado Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury.

Ao Coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, Prof. Dr. Márcio de Moraes.

À secretária da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, por toda atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo, por todo ensinamento e disponibilidade em me ajudar nestes anos. Obrigada por sempre ter dado apoio quando necessário, por ter acreditado no meu trabalho e pela confiança em mim!

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, por estar sempre disponível para contribuir com nossos trabalhos. Obrigada por todo apoio e dedicação em me ajudar. Nunca se esqueça da minha admiração e gratidão!

À Prof. Dra. Giselle Maria Marchi Baron, pela ótima convivência, pelo carinho e atenção que sempre dispensou a mim. Sempre acolhedora, boa conselheira e querida! Saiba que levarei as melhores lembranças da senhora!

Aos professores da Área de Dentística, Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins, Prof. Dr. Marcelo Giannini, pela convivência e por todo conhecimento transmitido na pós-graduação.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, por estar sempre disponível em ajudar nas análises estatísticas.

Ao biólogo Adriano Luis Martins, do Departamento de Microscopia Eletrônica de Varredura da FOP/UNICAMP, por toda paciência e dedicação em me ajudar neste trabalho.

À Profa. Dra. Priscila Liporoni e ao Prof. Jansen Ozaki pela oportunidade de fazer parte de uma equipe vitoriosa e extremamente competente. Aprendo sempre com vocês. Obrigada pelo acolhimento e confiança!

Aos colegas de doutorado: Carlos Eduardo, Diogo, Larissa, Lívia, Lúcia, Milena, Natália, Paulo, Priscila e Tiago, agradeço a colaboração de cada um de vocês para o meu crescimento!

Aos colegas de Pós-Graduação do Mestrado em Dentística, principalmente à Kamila Andrade, Núbia Pini e Alan Palialol pela convivência mais próxima e sempre agradável!

À minha colega de orientação Juliana do Carmo Públio, por dividirmos tantos dias felizes, com harmonia e respeito. Agradeço pelo aprendizado que me proporcionou com o seu valioso trabalho de mestrado. Saiba que sempre terá em mim uma amiga que torce pelo seu sucesso, pois sou testemunha de toda sua dedicação! Força time!

Aos meus queridos amigos Adriano Lima, Alan Palialol, Anderson Catelan, Bruno Barreto, Cecília Giorgi, Frederico Sampaio Neves, Hugo do Vale, Karla de Faria Vasconcelos, Larissa Sgarbosa Araújo, Lívia Gaglianone, Lucas Moura, Lúcia Trazzi, Maria Geronimi e Priscila Bertaglia, pela amizade e também pelo ótimo convívio durante nossa estada em Piracicaba. Desejo o melhor da vida para vocês...

À secretária da Área de Dentística Mônica Barnabé, pela disposição em me ajudar sempre que possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão do Auxílio Pesquisa (#10/50336-7), ajuda fundamental para que este trabalho fosse realizado.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o doutorado.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Dê a quem você ama :
- Asas para voar...
- Raízes para voltar...
- Motivos para ficar... "

(Dalai Lama)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a mudança de cor do esmalte e dentina após clareamento com géis de alta e baixa concentração em diferentes temperaturas. Cinquenta fragmentos dentais bovinos foram pigmentados em uma solução de chá preto. As amostras foram distribuídas aleatoriamente em 10 grupos (n=5) de acordo com o protocolo de clareamento: peróxido de carbamida 10% (PC) 4h/dia por 21 dias; peróxido de hidrogênio 6% (PH) com cálcio 1:30h/dia por 21 dias; PH 20% com cálcio 50 min/sessão com intervalo de 7 dias (3 sessões); HP 35% Blue com cálcio 40 min/sessão com 7 dias de intervalo (3 sessões); HP 35% Maxx 3x15 min/sessão com intervalo de 7 dias (3 sessões), e da temperatura de 22°C e 41°C. As amostras foram armazenadas em saliva artificial durante o todo experimento. A mudança de cor foi avaliada por meio de um espectrofotômetro (Konica Minolta CM 700d, Japan) e os dados expressos no valores do sistema CIE Lab. As leituras de cor do esmalte e dentina foram feitas após a pigmentação e após o final de cada semana de clareamento. Ainda, a superfície de esmalte de 3 amostras de cada grupo foram avaliadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para a coordenada L*, os dados foram analisados por medidas repetidas e teste de Tukey-Kramer (5% de nível de significância) e os valores de ΔE foram submetidos ao teste ANOVA 2 way e teste de Tukey (5% de nível de significância). Não houve diferença estatística significativa entre as temperaturas avaliadas de 22°C e 41°C. À 22°C, o PH 20% com cálcio mostrou as menores médias de reflectância diferindo estatisticamente de PC 10% e PH 6% com cálcio nas superfícies de esmalte e dentina. À 41°C, nenhuma diferença estatística entre os agentes clareadores foi observada após três semanas de tratamento. O peróxido de hidrogênio 20% com cálcio foi menos efetivo na temperatura ambiente no esmalte e na dentina. Entretanto, a temperatura de 41°C melhorou a eficácia deste agente clareador. Foram observadas alterações morfológicas na superfície de esmalte após o uso dos agentes clareadores, sendo que as maiores alterações ocorreram nos grupos tratados com géis com baixo pH.

Palavras chave: Clareamento dental; peróxido de hidrogênio; peróxido de carbamida; pigmentação dental; temperatura.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the enamel and dentin color changes after bleaching using low- and high-concentration gels at different temperatures. Fifty bovine teeth fragments were stained in a black tea solution. The samples were randomly placed in 10 groups (n=5) according to the bleaching protocol: 10% carbamide peroxide (CP) 4h/day for 21 days; 6% hydrogen peroxide (HP) with calcium 1.30h/day for 21 days; 20% HP with calcium 50 min/session with seven-day intervals (3 sessions); 35% HP Blue with calcium 40 min/session with seven-day intervals (3 sessions); 35% HP Maxx 3x15 min/session with seven-day intervals (3 sessions), and a gel temperature of 22°C and 41°C. The samples were stored in artificial saliva at all times during the experiment. Color change effectiveness was evaluated using a spectrophotometer (Konica Minolta CM 700d, Japan) and data was expressed in CIE Lab System values. The enamel and dentin color measurements were made after staining and at the end of each week of bleaching sessions. In addition, three enamel surface samples from each group were evaluated using a scanning electronic microscope (SEM). For the L* coordinate, data was analyzed by repeated-measures and Tukey-Krammer Test (5% significance level) and ΔE values were submitted to ANOVA 2-ways and Tukey tests (5% significance level). There were no statistical differences between the evaluated temperatures 22°C and 41°C. At 22°C, the 20% HP with calcium showed the lowest reflectance means differing statistically from 10% CP and 6% HP with calcium on the enamel and dentin surfaces. At 41°C, no statistical difference among bleaching agents was observed after three weeks of treatment. The 20% hydrogen peroxide with calcium was less effective at room temperature on enamel and dentin. However, the temperature at 41°C improved the efficacy of this bleaching agent. Morphology changes on enamel surface were observed after using the bleaching agents, being more pronounced in the groups treated with low pH gels and high-concentration agents.

Keywords: Dental bleaching; hydrogen peroxide; carbamide peroxide; dental staining; temperature.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO ÚNICO – Effectiveness of bleaching agents at different temperatures on enamel and dentin.	4
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
APÊNDICE	26

INTRODUÇÃO

A cor do dente é influenciada pela associação entre sua cor intrínseca e pela presença de manchas extrínsecas em sua superfície. A reflexão e absorção da luz pelo esmalte e dentina são os responsáveis pela imagem formada do objeto para o observador, sendo as propriedades ópticas da dentina de papel determinante (Joiner, 2006). Assim, as pigmentações presentes nestes dois substratos influenciam na percepção geral da cor dos dentes de um indivíduo.

As alterações de cor dentais podem ser definidas em categorias de acordo com a localização e a etiologia do manchamento. A pigmentação extrínseca ocorre pela deposição de pigmentos na superfície dental, causados pelo consumo de alimentos ou bebidas contendo corantes ou pelo uso de tabaco (Joiner, 2004). Já as alterações de cor intrínsecas, são definidas pela deposição de cromógenos na estrutura de esmalte e dentina durante a formação do dente, como por exemplo, a pigmentação do esmalte pela fluorose dental ou a da dentina causada com o uso de tetraciclina (Goldberg *et al.*, 2010). Nesses casos, produtos a base de peróxidos têm sido utilizados para realizar o clareamento da estrutura dental (Kim *et al.*, 2011) e promovendo, assim, uma estética mais favorável aos pacientes. Esse tratamento vem sendo amplamente utilizado por ser mais conservador do que os tratamentos restauradores, na obtenção de um sorriso mais agradável (Sa *et al.*, 2013).

Os tratamentos clareadores são realizados com o uso agentes à base de peróxido de hidrogênio (PH) ou peróxido de carbamida (PC) em diferentes concentrações. O processo químico do clareamento baseia-se na ionização do peróxido de hidrogênio resultando na produção de radicais livres, os quais são mais ou menos potentes durante a reação de oxidação dos pigmentos orgânicos existentes na estrutura dental, dependendo da influência de vários fatores à reação como temperatura, pH do meio, concentração do peróxido e tempo de ação disponível para uma melhor efetividade (Sun, 2000; Minoux *et al.*, 2008). Esta reação de clivagem ou redução das longas cadeias orgânicas, resulta em moléculas de pigmento pequenas o suficiente, para serem removidas da estrutura dental por meio de

difusão, ou faça com que estas moléculas menores absorvam menos luz dando aparência mais clara ao dente (Sulieman *et al.*, 2004).

Os agentes clareadores, atualmente, estão disponíveis na forma de gel, sendo utilizados em períodos determinados dependendo da sua concentração e da recomendação do fabricante. Os géis de baixa concentração, variam entre PC 10% à 22% e PH 3% à PH 10%, e são utilizados para o clareamento “caseiro”, sob orientação do cirurgião-dentista. Heywood & Heyman (1989) preconizaram esta técnica, com uso de PC10% em moldeiras individuais pelo paciente durante 6 a 8 horas por dia, durante 2 a 6 semanas. Este protocolo foi considerado mais seguro do que o adotado até então, com agentes à base de PH a 30-35%, utilizados para o mesmo fim havia mais de 75 anos (Haywood *et al.*, 1991).

Nesta técnica conhecida como de “consultório”, a aplicação do agente clareador sempre é feita pelo cirurgião-dentista e requer cuidados, como a proteção dos tecidos moles, devido à alta concentração dos peróxidos utilizados (Buchalla *et al.*, 2007). Assim, aplicação de PH 20% à 38% é realizada em sessões com intervalo de 7 dias entre cada uma delas (Lima *et al.*, 2009). De acordo com Sun (2000), na técnica de clareamento de consultório, a quebra do peróxido pode ser catalisada pelo uso de uma fonte de luz ou por um ativador químico. Durante anos, várias fontes de luz foram utilizadas, como laser, LEDs e lâmpadas halógenas, mas o aumento da eficácia dos géis clareadores pela ativação de fontes de luz tem sido bastante questionado (Joiner, 2006; Buchalla *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009).

Estudos apresentam resultados contraditórios em relação ao benefício da utilização de uma fonte de luz associada ao clareamento de consultório (Tavares *et al.*, 2003; Luk *et al.*, 2004; Sulieman, 2005; Lima *et al.*, 2009; 2011; D'Arce *et al.*, 2012). A grande preocupação na associação de uma fonte de energia ao agente clareador tem sido o aumento de temperatura causado na câmara pulpar (Zach *et al.*, 1965), uma vez que as fontes de energia têm sido utilizadas de forma empírica para ativar o peróxido de hidrogênio (Baik *et al.*, 2001; Joiner, 2006; Buchalla *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2011). Portanto, não se tem na literatura um protocolo definido para verificar se um pré-aquecimento do gel clareador

antes da sua aplicação, poderia alterar a reação de dissociação do peróxido de hidrogênio levando a uma melhora significativa na mudança de cor durante o tratamento clareador. Este aquecimento realizado fora da cavidade bucal seria mais seguro, não aumentando diretamente a temperatura dental, assegurando assim a manutenção da vitalidade pulpar.

Outra preocupação com os possíveis efeitos indesejáveis durante o tratamento clareador seria a alteração morfológica da superfície dental. Vários estudos utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura ou Microscopia de Força Atômica relataram dados contraditórios sobre tais alterações (Hegedus *et al.*, 1999; Justino *et al.*, 2004; Joiner, 2007; Xu *et al.*, 2011; Sa *et al.*, 2013), que podem ser causadas pela reação de oxidação do peróxido de hidrogênio durante o clareamento dental, ou ainda por um processo de desmineralização ácida com o uso de produtos com pH relativamente baixo (Joiner, 2007). Com a finalidade de minimizar estas possíveis erosões no esmalte, os fabricantes dos agentes clareadores tem adicionado cálcio em diferentes concentrações na sua composição (Cavalli *et al.*, 2010). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a mudança de cor do esmalte e dentina após o clareamento dental com géis de alta e baixa concentração de peróxidos, com ou sem adição de cálcio na sua formulação, em duas temperaturas diferentes.

CAPÍTULO ÚNICO

EFFECTIVENESS OF BLEACHING AGENTS AT DIFFERENT TEMPERATURES ON ENAMEL AND DENTIN

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the enamel and dentin color changes after bleaching using low- and high-concentration gels at different temperatures. Fifty bovine teeth fragments were stained in a black tea solution. The samples were randomly placed in 10 groups (n=5) according to the bleaching protocol: 10% carbamide peroxide (CP) 4h/day for 21 days; 6% hydrogen peroxide (HP) with calcium 1.30h/day for 21 days; 20% HP with calcium 50 min/sessions with seven-day intervals; 35% HP Blue with calcium 40 min/sessions with seven-day intervals; 35% HP Maxx 3x15 min/day with seven-day intervals, and a gel temperature of 22°C and 41°C. The samples were stored in artificial saliva at all times during the experiment. Color change effectiveness was evaluated using a spectrophotometer (Konica Minolta CM 700d, Japan) and data was expressed in CIE Lab System values. The enamel and dentin color measurements were made after staining and at the end of each week of bleaching sessions. In addition, three enamel surface samples from each group were evaluated using a scanning electronic microscope (SEM). For the L* coordinate, data was analyzed by repeated-measures and Tukey-Kramer Test (5% significance level) and ΔE values were submitted to ANOVA 2-ways and Tukey tests (5% significance level). There were no statistical differences between the evaluated temperatures 22°C and 41°C. At 22°C, the 20% HP with calcium showed the lowest reflectance means differing statistically from 10% CP and 6% HP with calcium on the enamel and dentin surfaces. At 41°C, no statistical difference among bleaching agents was observed after three weeks of treatment. The 20% hydrogen peroxide with calcium was less effective at room temperature on enamel and dentin when compared to low-concentration agents. However, the temperature at 41°C improved the efficacy of this bleaching agent. Morphology changes on enamel surface were observed after using the bleaching agents, being more pronounced in the groups treated with low pH gels and high-

concentration agents.

Keywords: Dental bleaching; hydrogen peroxide; carbamide peroxide; dental staining; temperature.

INTRODUCTION

Dental bleaching occurs when hydrogen peroxide breaks down and releases more or less powerful oxygen radicals, depending on some factors that influence this reaction, such as the pH, concentration of reactants, and temperature increases. These oxygen radicals act by cleaving to the organic pigments molecules in dentin, leaving them smaller until removed by diffusion from the dental structure ^{1, 2}.

Attempts to improve the dental bleaching's effectiveness by heating the hydrogen peroxide was reported by Abbot ³ using a high-intensity lamp to raise the hydrogen peroxide's temperature thus making it the catalyst to release the bleaching agent's reaction. For years, many authors have investigated different light sources (halogen, plasma arc, CO₂ laser, and diode laser) as the bleaching catalyst using high concentrations of hydrogen peroxide, but these studies produced conflicting results ⁴⁻¹⁰. Some authors concluded that the use of light sources made the bleaching agents more effective ⁸⁻¹⁰, and others reported that light sources did not improve the treatment ⁴⁻⁷.

The greatest concern about the association between the bleaching agent and the light source has been the intrapulpal temperature rise ¹¹. Since there is no defined protocol for this source's use, it has been used empirically to activate the hydrogen peroxide ¹²⁻¹⁴. The high-irradiance light sources generates heat, thereby increasing the bleaching agent and tooth temperatures ^{12, 13}.

No studies in literature show if the rise in the bleaching agent's temperature within the clinically acceptable limits avoiding pulp damage, which increases the bleaching efficiency. This study evaluated the enamel color change effectiveness using bleaching gels at controlled temperatures of 22°C and 41°C, and if the gels' temperature affected the color changes in depth.

MATERIALS AND METHODS

Fifty bovine incisors were cleaned and stored in a 0.1% timol solution. These teeth were examined to find any gaps or stains that might interfere with the study's results. After the teeth selection, the crowns were separated using a double-faced diamond disc (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) in a low-speed handpiece under constant water irrigation.

The teeth fragments (5mm x 5mm) were made with a precision low-speed diamond saw (Isomet 100, Buheler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). The enamel and dentin surfaces were abraded with silicon carbide (SiC) sandpapers with #600 and #1200 grit under constant irrigation, until the surfaces exhibited a 3.5mm thick (1.0mm enamel and 2.5mm dentin). To standardize the sample position in the spectrophotometer (Konica Minolta CM 700d, Japan), each sample was marked with a diamond burr #1012 on one of the dentin sides. Then, the bovine fragments were randomly placed in 10 groups (n=5) according the bleaching protocol and the bleaching gels temperature (22°C or 41°C).

The fragments were immersed in a black tea solution for six days at room temperature to discolor the enamel and dentin surfaces. This solution was obtained by immersion of 1.6g of black tea (Chá Preto Leão, Brasil) in 100ml of boiling water for five minutes. The solution was changed after 24 hours¹⁵. After this discoloration sequence, the samples were stored in artificial saliva for two weeks for color stabilization. Before the initial reading, the samples surfaces were cleaned with pumice by using a polishing rubber mounted at a contra angle to remove any extrinsic stains⁵.

For the enamel and dentin surfaces color readings, the samples were positioned in a sample carrier to standardized the reading position. To standardize the ambient light during the measurement process, this conjunct was taken in a light cabin (GTI Mini Matcher MM1e, GTI Graphic Technology Inc., Newburgh, NY, USA) by selecting the “daylight” (D65) option for all readings. Then the samples were subjected to a reading with the spectrophotometer. Data was read using the On Color QC Lite (Konica Minolta, Japan) in a computer.

During the bleaching protocol, the samples were fixed and a homogeneous thickness of the bleaching agent (approximately 1mm) was applied on the tooth enamel

surface. The bleaching treatments were according the manufacturer instructions, following these protocols:

- **Groups 1 (22°C) and 2 (41°C): 10% carbamide peroxide (Whiteness Perfect–FGM, SC, Brazil)**

Approximately 1ml of bleaching agent was deposited in an Eppendorf tube and cooled to 22°C by immersion in cold water (Group 1) or heated to 41°C (Group 2) by a dry incubator (Astory, Italy). The gel temperatures were measured using a digital thermometer (Digital Thermometer TH-1300, Instrutherm Instrumentos de Medida Ltda, SP, Brazil) before the bleaching process. The bleaching agent was then deposited on enamel surface and remained in contact for four hours, according to the manufacturer's recommendations. The samples were positioned into an apparatus containing water to prevent dehydration, but without contact on the surface with the gel. This apparatus was closed and brought to 37°C for 4h to simulate the oral cavity's temperature and humidity conditions. Then the samples were thoroughly washed with water and stored in artificial saliva until the next bleaching session. The bleaching sessions were performed daily for 21 days.

- **Groups 3 (22°C) and 4 (41°C): 6% hydrogen peroxide with calcium (WhiteClass–FGM, SC, Brazil)**

The bleaching agent was applied in a similar manner according to groups 1 and 2; however, the gel remained on the enamel surface for 1:30 h. The bleaching sessions were performed daily for 21 days.

- **Groups 5 (22°C) and 6 (41°C): 20% hydrogen peroxide with calcium (Whiteness HP Blue–FGM, SC, Brazil)**

After reaching the correct temperature, the bleaching agent remained on the enamel surface for 50 minutes at room temperature, according to the manufacturer's recommendations. Three bleaching sessions were performed and the interval between them was seven days.

- **Groups 7 (22°C) and 8 (41°C): 35% hydrogen peroxide with calcium (Whiteness HP Blue–FGM, SC, Brazil)**

After reaching the correct temperature, the bleaching agent remained on the

enamel surface for 40 minutes at room temperature, according to the manufacturer's recommendations. Three bleaching sessions were performed and the interval between them was seven days.

- **Groups 9 (22°C) and 10 (41°C): 35% hydrogen peroxide (Whiteness HP Maxx-FGM, SC, Brazil)**

After reaching the correct temperature for each application, the bleaching agent remained three times on the enamel surface at room temperature for 15 minutes, according to manufacturer's recommendations. Three bleaching sessions were performed and the interval between them was seven days.

At the end of each bleaching session, the samples were washed with water and stored in artificial saliva at 37°C. At the end of each week of the bleaching treatments, after a 24h period for the samples' rehydration in artificial saliva, a new color reading was obtained.

For analysis under Scanning Electron Microscopy (SEM), thirty three bovine teeth fragments were also abraded with silicon carbide (SiC) papers with #600 and #1200 grit under constant irrigation, as described previously. The samples were polished on felt (TOP, RAM and SUPRA – Arotec, Cotia, SP, Brazil) with metallographic diamond paste (6 µm/TOP; 3 µm/RAM; 1 µm/SUPRA – Arotec, Cotia, SP, Brazil) and lubricating oil (Arotec – Metallographic preparation, Cotia, SP, Brazil), to achieve a smooth enamel surface. In the interval between each felt and paste, the samples were cleaned with distilled water in a ultrasonic bath (T7 Type, CT Model, Thornton-Inpec Electronic Ltd, Vinhedo, SP, Brazil). Then, these samples were randomly placed in 11 groups (n=3) and the same bleaching treatments were performed (10 groups), and one untreated group (control) was stored in artificial saliva during the process. After the end of sessions, the samples were dehydrated by immersion in alcohol solutions and coated with approximately 20nm golden alloy for further SEM observation. Photomicrographs were obtained (JEOL JSM-5600 LV, Tokyo, Japan) with magnification of 4000x, and the most representative areas of each specimen were used to illustrate the enamel surface morphology. In order to enable a better images interpretation, the pH of the bleaching agents was measured (Table 1) using the Orion 290A+ pH meter (Thermo Electron Corporation).

After exploratory data analysis and selection of the best covariance structure, the variable L* value was analyzed by mixed models for repeated-measures by the PROC MIXED procedure of SAS program and the mean comparison was made using a Tukey-Krammer Test (5% significance level). The variable ΔE was analyzed using the ANOVA 2-way and Tukey's test (5% significance level).

Table 1. Bleaching agents pH values.

BLEACHING AGENTS	pH at 22°C	pH at 41°C
10% CP	6.02	5.98
6% HP	6.00	5.78
20% HP	9.43	9.28
35% HP Blue	8.63	8.55
35% HP Maxx	6.00	5.54

10% CP (Carbamide Peroxide) = Whiteness Perfect 10% - FGM; 6% HP (Hydrogen Peroxide) = WhiteClass – FGM; 20% HP= Whiteness HP Blue – FGM; 35% HP Blue = Whiteness HP Blue – FGM; 35% HP Maxx= Whiteness HP Maxx – FGM.

RESULTS

Table 2 (Enamel L* means) showed in the first week of bleaching at 22°C that 20% hydrogen peroxide (HP) and 35% HP Blue did not differ from the baseline. In the second week of bleaching all treatments, except for 20% HP, improved their L* means and differed from the previous time. Comparing the treatments at the same time, the 20% HP had the lowest value differing from the 10% carbamide peroxide (CP) and 6% HP during the dental bleaching sessions.

Table 2. Enamel L* means (SD).

Temp	Treatment	Time			
		Baseline	1 st week	2 nd week	3 rd week
22°C	10%CP	72.7 (1.6) Ca	77.9 (0.6) Ba	80.3 (0.6) Aa	81.7 (0.5) Aa
	6%HP	73.6 (1.5) Ca	77.5 (1.4) Ba	79.7 (1.2) Aa	80.9 (1.0) Aa
	20%HP	72.8 (1.1) Ba	73.4 (1.8) Bb	74.0 (2.0) ABb	75.1 (2.3) Ab
	35%HPBlue	73.7 (1.2) Ba	75.2 (1.8) Bab	77.1 (2.3) Aab	78.7 (1.7) Aab
	35%HPMaxx	72.4 (1.8) Ca	75.0 (2.2) Bab	76.7 (2.0) Aab	78.4 (1.7) Aab
41°C	10%CP	73.7 (1.2) Ca	77.7 (0.8) Ba	80.1 (0.7) Aa	81.3 (0.7) Aa
	6%HP	72.1 (2.5) Ca	75.5 (2.5) Ba	77.9 (2.0) Aab	79.1 (2.2) Aa
	20%HP	73.0 (1.4) Ca	75.0 (2.0) Ba	76.5 (1.3) ABab	77.9 (1.7) Aa
	35%HPBlue	73.5 (1.0) Ca	74.4 (1.4) BCa	76.0 (1.3) ABb	77.5 (1.2) Aa
	35%HPMaxx	73.0 (1.0) Da	76.3 (0.8) Ca	78.1 (0.4) Bab	79.9 (0.3) Aa

Means values followed by different letters for the Tukey test ($p < 0.05$). Capital letters are read horizontally and lower cases vertically. No statistical difference between temperatures ($p = 0.8220$).

At 41°C, the treatments differed from the baseline, except for the 35% HP Blue. In the second week, the 35% HP Blue differed from the baseline and, compared with other treatments, showed the lowest value differing from the 10% CP. The 20% HP didn't differ between the first and second weeks. In the third week of bleaching, the 35% HP Maxx was the only treatment that differed from the previous time. There was no difference among the treatments at the end of the bleaching process.

For Table 3 (Dentin L* means) at 22°C, the 20% HP presented no statistical significance from the baseline until the end of the treatments. The 35% HP Blue and 35% HP Maxx treatments differed from the baseline from the second week. At the end of the third week, the 20% HP showed the lowest mean differing from the 10% CP and 6% HP. At 41°C, the 6% HP showed no statistical difference from the baseline, and the 20% HP and 35% HP Blue had the same behavior until the end of second week. There was no statistical difference among the treatments each time they were studied.

Table 3. Dentin L* means (SD).

Temp	Treatment	Time			
		Baseline	1 st week	2 nd week	3 rd week
22°C	10%CP	61.0 (3.0) Da	64.0 (3.1) Ca	68.7 (2.5) Ba	71.3 (2.8) Aa
	6%HP	61.0 (2.1) Ca	65.0 (1.6) Ba	68.8 (1.5) Aa	71.3 (1.4) Aa
	20%HP	61.6 (2.2) Aa	62.1 (1.9) Aa	62.6 (2.6) Aa	64.2 (3.9) Ab
	35%HPBlue	61.2 (1.6) Ca	62.1 (2.1) Ca	65.8 (2.5) Ba	68.4 (2.0) Aab
	35%HPMaxx	61.1 (2.2) Ca	63.0 (3.1) BCa	65.1 (3.9) Ba	69.5 (2.5) Aab
41°C	10%CP	61.0 (2.7) Da	63.7 (2.9) Ca	67.2 (3.1) Ba	70.5 (2.7) Aa
	6%HP	61.7 (2.2) Ba	64.2 (1.9) Ba	68.3 (1.8) Aa	70.7 (1.7) Aa
	20%HP	61.6 (1.9) Ba	62.3 (1.6) Ba	63.6 (2.1) Ba	67.0 (2.1) Aa
	35%HPBlue	60.8 (2.2) Ba	61.6 (2.4) Ba	63.2 (3.5) Ba	66.2 (4.3) Aa
	35%HPMaxx	61.7 (2.0) Da	64.3 (3.6) Ca	67.3 (3.3) Ba	72.5 (4.2) Aa

Means values followed by different letters for the Tukey test ($p < 0.05$). Capital letters are read horizontally and lower cases vertically. No statistical difference between temperatures ($p = 0.8999$).

Table 4 (Enamel ΔE means), for $\Delta E1$ the 20% HP and 35% HP Blue had the lowest means that differed from 10% CP. For $\Delta E2$ and $\Delta E3$ (22°C), 10% CP had the highest mean differing from the high-concentration treatments. At 41°C, the 10% CP had the highest mean differing from the 35% HP Blue.

Table 4. Enamel ΔE means (SD).

Treatment	$\Delta E 1(\text{Baseline} \times 1^{\text{st}} \text{ week})$		$\Delta E 2(1^{\text{st}} \times 2^{\text{nd}} \text{ weeks})$		$\Delta E 3(2^{\text{nd}} \times 3^{\text{rd}} \text{ weeks})$	
	22°C	41°C	22°C	41°C	22°C	41°C
10% CP	5.8 (2.1) Aa	5.3 (1.2) Aa	8.0 (1.9) Aa	7.0 (1.5) Aa	9.5 (1.8) Aa	8.1 (1.8) Aa
6%HP	4.2 (0.7) Aab	4.2 (0.7) Aab	4.3 (1.7) Ac	6.1 (0.6) Aab	7.6 (0.7) Aab	7.4 (0.8) Aab
20%HP	3.5 (1.3) Ab	3.8 (1.8) Ab	6.3 (0.6) Ab	5.1 (1.7) Abc	4.7 (1.6) Ac	6.0 (1.7) Aab
35% HPBlue	3.4 (0.6) Ab	3.7 (1.3) Ab	4.9 (0.8) Ac	4.7 (0.8) Ac	5.8 (0.8) Abc	5.4 (0.4) Ab
35% HPMaxx	4.8 (0.9) Aab	4.3 (0.9) Aab	5.7 (0.7) Abc	5.8 (0.8) Abc	6.7 (1.3) Ab	7.5 (0.9) Aab

Means values followed by different letters (Capital letters are read horizontally and lower cases vertically in the same time) differ among them ($p \leq 0.05$).

Table 5 (Dentin ΔE means), for $\Delta E1$ at 22°C the 35% HP Blue had the lowest mean differing from 6% HP. For $\Delta E3$, 20% HP presented the lowest mean not differing from 35% HP Blue at 22°C. At 41°C, the 35% HP Maxx presented the highest mean

differing from the 20% HP and 35% HP Blue. There were no statistical differences between the evaluated temperatures.

Table 5. Dentin ΔE means (SD).

Treatment	ΔE 1(Baseline x 1 st week)		ΔE 2(1 st x 2 nd weeks)		ΔE 3(2 nd x 3 rd weeks)	
	22°C	41°C	22°C	41°C	22°C	41°C
10%CP	3.8 (1.3) Aab	3.2 (0.9) Aa	8.7 (2.0) Aa	7.2 (1.5) Aa	11.4 (1.9) Aa	10.6 (1.1) Aab
6%HP	4.4 (0.9) Aa	3.0 (0.8) Aa	8.4 (1.0) Aab	7.1 (0.4) Aa	10.9 (0.9) Aa	9.8 (1.8) Aab
20%HP	2.6 (1.5) Aab	1.6 (0.8) Aa	2.7 (1.6) Ac	2.6 (1.0) Ab	3.9 (1.6) Ab	6.1 (0.8) Ab
35% HPBlue	1.9 (0.7) Ab	3.5 (2.9) Aa	5.1 (2.2) Abc	4.0 (1.5) Aab	7.9 (2.2) Aab	6.0 (2.3) Ab
35%HPMaxx	3.7 (0.6) Aab	3.6 (1.1) Aa	4.6 (2.6) Ac	6.4 (1.7) Aa	9.2 (2.0) Aa	13.2 (5.2) Aa

Means values followed by different letters (Capital letters are read horizontally and lower cases vertically in the same time) differ among them ($p \leq 0.05$).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

All photomicrographs showed changes in enamel morphology when compared to the control group (Figs 1, 2 and 3). The group treated with 10% CP, presented erosion and depression in enamel surface with some apparent enamel prisms. The surface treated with 6% HP showed an eroded surface, with an increased number of pores, and more apparent prisms when compared to 10% CP. The group treated with 20% HP also showed a depression and irregular surface, with presence of some pores.

The group treated with 35% HP Maxx presented enamel surface with more erosion, depression and pores, when compared with the group treated with 35% HP Blue.

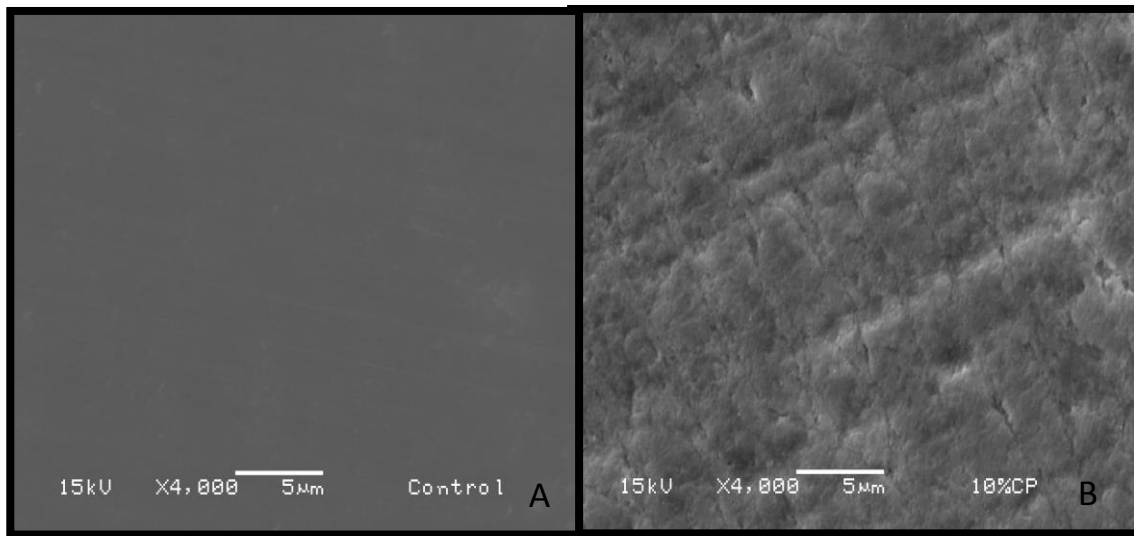


Figure 1. SEM analysis of the enamel surfaces after bleaching treatments, with magnification of 4000x. A) Control Group; B) 10% Carbamide Peroxide.

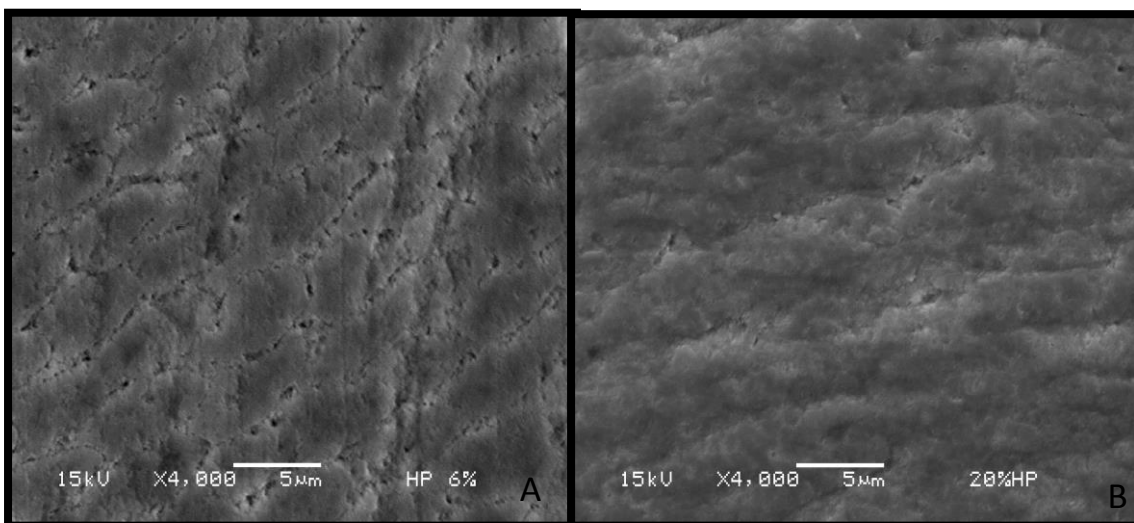


Figure 2. SEM analysis of the enamel surfaces after bleaching treatments, with magnification of 4000x. A) 6% Hydrogen Peroxide with calcium; B) 20% Hydrogen Peroxide with calcium.

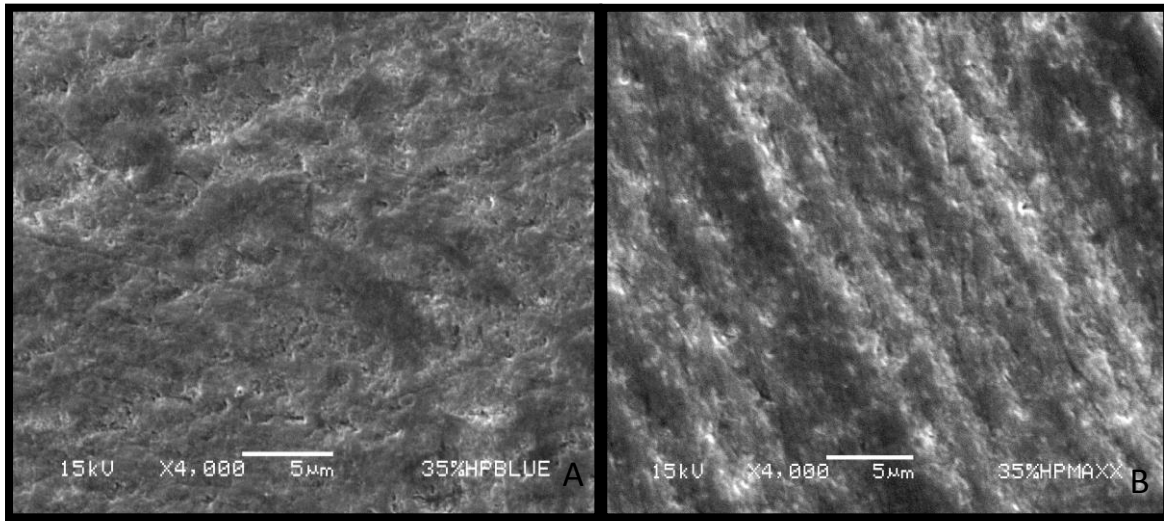


Figure 3. SEM analysis of the enamel surfaces after bleaching treatments, with magnification of 4000x. A) 35% Hydrogen Peroxide with calcium; B) 35% Hydrogen Peroxide without calcium.

DISCUSSION

To standardized the enamel and dentin samples' thicknesses, bovine teeth were used for their flat labial surface¹⁶⁻¹⁸. According to Hanning *et al.*¹⁹ the physicochemical characteristics of human and bovine teeth do not differ significantly, despite the diameter variations of the dentinal tubules near enamel-dentin junction (bovines with 20.000 tubules/mm² range 3-5µm and humans with 10.000 to 25.000 tubules/mm² range 0,5 to 1,2µm). Furthermore, to justify the use of bovine incisors, Attia *et al.*²⁰ reported that during the bleaching process, human and bovine substrates showed similar behaviors, probably due their morphological similarity.

The fragments' color change was measured by spectrophotometry using the CIE Lab System to define the color on tridimensional space. This system describes the color numerically according three coordinates: L* refers to luminosity (L+= higher luminosity and L-= low luminosity), the a* coordinate refers a red (a*+) and green (a*-) range, and the b* coordinate refers to the yellow (b*+) and blue (b*-) range^{21, 22}. The difference between two colors on these tridimensional space are found by using the formula $\Delta E = [(L_1 - L_0)^2 + (a_1 - a_0)^2 + (b_1 - b_0)^2]^{1/2}$. Thus, the general color alteration (ΔE) was calculated between the studied times, quantifying numerically this alteration; however, the value

doesn't determine the color change direction of the coordinates L^* , a^* , b^* ²³. According to Dietschi *et al.* ¹⁶, analyzing the three coordinates separately, the L^* value (luminosity) would be the most relevant for comparing products under experimental conditions.

In the present study, analyzing Table 2 (Enamel L^* means), after the first week of bleaching with the high-concentration gels with calcium (20% HP and 35% HP Blue) did not statically differ from the baseline at 22 °C, presenting a worse performance compared to the others agents tested. Also, this high concentration with calcium gels needed more bleaching sessions to achieve a significant color alteration. At 41 °C, the high-concentration with calcium color alteration also presented the efficacy impaired during the sessions. Moreover, analyzing Table 4 (Enamel ΔE means), 20% HP and 35% HP Blue presented an impaired performance compared to 10% CP among the bleaching sessions.

According to Kwon ²⁴, the bleaching process causes microporosity on dental structures as a result of transient mineral loss, regardless of the gel's pH. It is more likely that this morphological change occurs when high-concentration gels were used ^{25, 26}. Otherwise, Sulieman *et al.* ²⁷ reported that low pH value of bleaching agents might induce prejudicial effects during bleaching treatment, leading to more substantial erosion in enamel surface ²⁸. The addition of calcium and fluoride to composition of bleaching gels appeared as an alternative to reduce this temporary loss of calcium and phosphate ions from dental surfaces during the bleaching ²⁹. The suggest hypothesis was that the high-concentration agents with calcium in their composition would have a difficult bleaching action, since their diffusion through the tooth structures would be slower. Probably, the gel remained saturated with more calcium ions than the tooth surface, making the tooth mineral loss more difficult^{30, 31}, thus hindering the oxygen-free radicals through the enamel rods. Also, the high-concentration gels with calcium used in the present study showed an alkaline pH value (Table 1), which contributed to a less microporosities generation on enamel surface, leading to poor hydrogen peroxide diffusion into the dental structure.

Temperatures of 22°C and 41°C did not differ regarding the effectiveness of the treatment. However, the gels presented a different behavior within each temperature. At the 22°C, 20% HP with calcium showed worse behavior on the color change than low-concentration agents. Despite the high concentration of 20% HP when compared to the

low concentration agents, the application time recommended by the manufacturer was 50 minutes, which could not have been enough for an effective bleaching action. The low-concentration agents remained in contact with teeth for a longer time, compensating for the lower HP concentration available for bleaching the enamel surface, justifying this best performance^{32, 33}.

Nevertheless, when the 20% HP with calcium was preheated to 41°C, it did not differ from the other bleaching agents. This shows that at this concentration, peroxide with calcium had an improved performance after the preheating. According to Sun², many factors could influence the chemical reaction of bleaching, as the reactants' concentration and the temperature rise. Several studies agree with the theory that heating accelerates the breakdown of HP^{12, 13, 34, 35}. Torres *et al.*¹⁸ reported that the gel temperature rise might promote HP penetration through the dental structure. It has been shown that the temperatures rises to 10°C leads the rate of bleaching agents chemical reaction speed duplicates^{8, 36, 37}. Then, the thermal energy increases the hydroxyl radical generation³⁸ from hydrogen peroxides dissociation. The bleaching agent temperature preheated to 41°C was enough to accelerate the hydrogen peroxide dissociates rates and have compensated for this bleaching agent lower permeability, resulting in an improved the 20% HP action.

Table 3 results (Dentin L* means) showed similar behavior of 20% HP and 35% HP Blue, previously analyzed for enamel surface, and presented a poor efficacy during the sessions. At 22°C, the 20% HP did not show a difference in bleaching result among the weeks. Additionally, this behavior had deficits in its impaired effectiveness at the end of the bleaching treatment when compared with the 10% CP and 6% HP color changes. Furthermore, analyzing Table 5 (Dentin ΔE means) the 20% HP presented the lowest mean not differing only to 35% HP Blue at $\Delta E2$ and $\Delta E3$.

In the present study, the bleaching agent was applied on enamel surface, and its action depends on the oxygen-free radicals diffusion capacity through tooth structure. As described, the ineffectiveness of 20% HP in depth may be related to the permeability of the teeth complicated by calcium in the composition or the lack of a longer time to keep the gel on a tooth surface, since the diffusion of HP depends on the bleaching agent concentration in relation to contact time with the dentine^{32, 33}.

Once again, when the 20% HP with calcium was preheated to 41°C, it did not differ from the other bleaching agents after the end of the bleaching sessions. The temperature increases lead to a higher kinetic energy or more movement of the particles in this bleaching reaction. Then, the bleaching reaction accelerates and the speed of HP diffusion increases³⁹. David *et al.*³⁹ related that HP diffusion coefficient at 25°C is 1.03 cm²/day and increases to 1.48 cm²/day at 40°C. So, if this temperature rises at 41°C was enough to accelerate the breakdown of HP, then the result was greater diffusion of oxygen-free radical reagents into the dentin tissue, resulting in a better bleaching action during the studied times.

Despite the 20% HP bleaching agent showing some behavior changes after preheating at 41°C, no significant difference between samples at 22°C and 41°C was demonstrated in terms of the bleaching's effectiveness. Moreover, Davidi *et al.*³⁹ concluded in an in vitro study that the use of 35% HP heated at 45°C improved its effectiveness compared with a 37°C heat application. This result was probably better because during the 20 minutes bleaching treatment, the gel heated at 45°C was applied every five minutes, and the color change evaluation was made immediately before each of these applications. Thus, the replacement of this heated gel allowed for an improvement in efficacy. Furthermore, 45°C is not considered clinically safe.

Intrapulpal heating above 5.5°C can result in an irreversible pulpitis^{11, 37}. Therefore, bleaching treatment safety is directly related to increased temperatures, which also occur using the light sources to catalyze the procedure. According to Lima *et al.*⁷ the activation protocol remains empirical, and energy sources' activation used in tooth bleaching deserves more attention. Eldeniz *et al.*⁴⁰ evaluated the in vitro intrapulpal temperature's increase during the bleaching process as catalyzed by different light sources. The authors reported that the laser diode used increased the temperature by 11.7°C, while high-intensity halogen lamp added 7.8°C, QTH (Quartz tungsten halogen) added 6.35°C, and the LEDs increased 6°C. Several authors reported that the use of light sources do not improve the bleaching treatment's effectiveness^{4-7, 41}. Nevertheless, these studies evaluated this effectiveness only on the enamel surface and not on the dentine surface.

The gel temperatures preheated to 41°C is within an acceptable range to ensure the

treatment's safety, and this gels temperature rise was performed only to start the hydrogen peroxides dissociation. Additionally, temperature increases also improved the 20% HP with calcium in enamel and dentin bleaching. This did not occur with the low-concentration agents, probably due the gels remaining time on the samples was greater than the high-concentration application time, and the faster dissociation of hydrogen peroxides promoted for temperature rise not interfered on its efficacy. Also, this temperature rise to 41°C did not enhance the 35% HP Maxx and 35% HP Blue performance either. Since their bests results were achieved at 22°C already, this preheat temperature may not accelerates the hydrogen peroxides reaction in a significantly speed to enhanced their effectiveness, like as occur when the temperatures rise each 10 °C, described previously.

Concerning to enamel morphologic alterations, observed after the bleaching process, the SEM analysis showed that all bleaching agents promoted changes on the surface compared to control group (Fig 1A). The 10% CP dissociates into hydrogen peroxide and urea². The urea, was able to affect the interprismatic regions after penetrated through enamel, attacking protein structures, which might contribute to morphology changes on enamel surface⁴²⁻⁴⁴, as presented in Figure 1B. In addition the 10% CP had a low pH value (~ 6.0), which contributed to enamel demineralizing process. Xu *et al.*²⁸ reported that enamel decalcification might occur by bleaching treatment with pH around 6.7-6.8, which is higher than the critical pH (5.5) to enamel demineralization. In present study, the gel remained for 4h in contact with enamel surface and this fact might contribute to wider enamel side effects.

Similarly, the groups treated with 6% HP (Fig 2A) and 35% HP Maxx (Fig 3B) also showed a demineralized enamel surface, which might be associated to low pH (~ 6.0), as well the higher hydrogen peroxide concentration when compared to 10% CP. According to Kim *et al.*⁴⁵, the strong oxidative act of the reactive oxygen radical, generated from the hydrogen peroxide release, acts on the organic matrix of tooth. Thus, the amount of hydrogen peroxide used in bleaching process might interfere at side effects observed such as microporosities.

The group treated with 20% HP showed an irregular surface with some pores (Fig

2B). Despite this bleaching agent presented an alkaline pH value (~9.2), which avoids primarily demineralization effects caused by acidic erosion processes⁴⁶, the amount of hydrogen peroxide presented in this gel promoted the surface alterations. In the same way, the high pH value (~8.5) showed by 35% HP Blue (Fig 3A) also did not prevent more pronounced enamel morphology changes, when compared to the previous group, probably due the higher hydrogen peroxide concentration in this bleaching agent.

Given the above considerations, the results of this in vitro study showed that the 20% hydrogen peroxide with calcium was less effective at room temperature on enamel and deep dentin when compared to low-concentration bleaching agents. However, the temperature at 41°C improved the efficacy of this bleaching agent. Morphology changes on enamel surface were observed after using the bleaching agents, being more pronounced in the groups treated with low pH gels and high-concentration of hydrogen peroxide.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP), São Paulo, Brazil (Grant # 10/50336-7).

REFERENCES

1. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. *Quintessence Int.* 2008 Sep;39(8):645-59.
2. Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dent Clin North Am.* 2000 Oct;44(4):831-50.
3. Abbot CH. Bleaching discolored teeth by means of 30% perhydrol and the electric light rays. *J Allied Dent Soc* 1918 13(259).
4. Bernardon JK, Sartori N, Ballarin A, Perdigao J, Lopes GC, Baratieri LN. Clinical performance of vital bleaching techniques. *Oper Dent.* 2010 Jan-Feb;35(1):3-10.

5. D'Arce MB, Lima DA, Aguiar FH, Ambrosano GM, Munin E, Lovadino JR. Evaluation of ultrasound and light sources as bleaching catalysts - an in vitro study. *Eur J Esthet Dent*. 2012 Summer;7(2):176-84.
6. Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. In vitro evaluation of the effectiveness of bleaching agents activated by different light sources. *J Prosthodont*. 2009 Apr;18(3):249-54.
7. Lima DA, Aguiar FH, Liporoni PC, Munin E, Ambrosano GM, Lovadino JR. Influence of chemical or physical catalysts on high concentration bleaching agents. *Eur J Esthet Dent*. 2011 Winter;6(4):454-66.
8. Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *J Am Dent Assoc*. 2004 Feb;135(2):194-201; quiz 28-9.
9. Ontiveros JC, Paravina RD. Color change of vital teeth exposed to bleaching performed with and without supplementary light. *J Dent*. 2009 Nov;37(11):840-7.
10. Sulieman M. An overview of bleaching techniques: 3. In-surgery or power bleaching. *Dent Update*. 2005 Mar;32(2):101-4, 7-8.
11. Zach L, Cohen G. Pulp Response to Externally Applied Heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Apr;19(5):15-30.
12. Baik JW, Rueggeberg FA, Liewehr FR. Effect of light-enhanced bleaching on in vitro surface and intrapulpal temperature rise. *J Esthet Restor Dent*. 2001 13(6):370-8.
13. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. *Dent Mater*. 2007 May;23(5):586-96.
14. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent*. 2006 Aug;34(7):412-9.
15. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Development and evaluation of a method in vitro to study the effectiveness of tooth bleaching. *J Dent*. 2003 Aug;31(6):415-22.
16. Dietschi D, Benbachir N, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of home bleaching and over-the-counter bleaching products. *Quintessence Int*. 2010 Jun;41(6):505-16.
17. Dietschi D, Rossier S, Krejci I. In vitro colorimetric evaluation of the efficacy of various bleaching methods and products. *Quintessence Int*. 2006 Jul-Aug;37(7):515-26.

18. Torres CR, Wiegand A, Sener B, Attin T. Influence of chemical activation of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on its penetration and efficacy--in vitro study. *J Dent.* 2010 Oct;38(10):838-46.
19. Hannig C, Weinhold HC, Becker K, Attin T. Diffusion of peroxides through dentine in vitro with and without prior use of a desensitizing varnish. *Clin Oral Investig.* 2011 Dec;15(6):863-8.
20. Attia ML, Aguiar FH, Mathias P, Ambrosano GM, Fontes CM, Liporoni PC. The effect of coffee solution on tooth color during home bleaching applications. *Am J Dent.* 2009 Jun;22(3):175-9.
21. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent.* 2004 32 Suppl 1(3-12).
22. Li Y. Tooth color measurement using Chroma Meter: techniques, advantages, and disadvantages. *J Esthet Restor Dent.* 2003 15 Suppl 1(S33-41).
23. Turkun M, Celik EU, Aladag A, Gokay N. One-year clinical evaluation of the efficacy of a new daytime at-home bleaching technique. *J Esthet Restor Dent.* 2010 Apr;22(2):139-46.
24. Kwon YH, Huo MS, Kim KH, Kim SK, Kim YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil.* 2002 May;29(5):473-7.
25. Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Braz Oral Res.* 2004 Oct-Dec;18(4):306-11.
26. Reis A, Dalanhol AP, Cunha TS, Kossatz S, Loguercio AD. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. *Oper Dent.* 2011 Jan-Feb;36(1):12-7.
27. Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees JS. A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *J Dent.* 2004 Sep;32(7):581-90.
28. Xu B, Li Q, Wang Y. Effects of pH values of hydrogen peroxide bleaching agents on enamel surface properties. *Oper Dent.* 2011 Sep-Oct;36(5):554-62.

29. Cavalli V, Rodrigues LK, Paes-Leme AF, Brancalion ML, Arruda MA, Berger SB, et al. Effects of bleaching agents containing fluoride and calcium on human enamel. *Quintessence Int.* 2010 Sep;41(8):e157-65.
30. Gao XJ, Elliott JC, Anderson P. Scanning and contact microradiographic study of the effect of degree of saturation on the rate of enamel demineralization. *J Dent Res.* 1991 Oct;70(10):1332-7.
31. Price RB, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of tooth-whitening products. *J Can Dent Assoc.* 2000 Sep;66(8):421-6.
32. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. *J Dent Res.* 1993 May;72(5):931-8.
33. Gokay O, Mujdeci A, Algin E. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J.* 2005 Aug;38(8):516-20.
34. Chen JH, Xu JW, Shing CX. Decomposition rate of hydrogen peroxide bleaching agents under various chemical and physical conditions. *J Prosthet Dent.* 1993 Jan;69(1):46-8.
35. Goldstein RE. In-office bleaching: where we came from, where we are today. *J Am Dent Assoc.* 1997 Apr;128 Suppl(11S-5S).
36. Bowles WH, Thompson LR. Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *J Endod.* 1986 Mar;12(3):108-12.
37. Caviedes-Bucheli J, Ariza-Garcia G, Restrepo-Mendez S, Rios-Osorio N, Lombana N, Munoz HR. The effect of tooth bleaching on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1462-5.
38. Shirato M, Ikai H, Nakamura K, Hayashi E, Kanno T, Sasaki K, et al. Synergistic effect of thermal energy on bactericidal action of photolysis of H₂O₂ in relation to acceleration of hydroxyl radical generation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):295-301.
39. Davidi MP, Hadad A, Weiss EI, Domb A, Mizrahi B, Sterer N. The effect of a mild increase in temperature on tooth bleaching. *Quintessence Int.* 2008 Oct;39(9):771-5.

40. Eldeniz AU, Usumez A, Usumez S, Ozturk N. Pulpal temperature rise during light-activated bleaching. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Feb 15;72(2):254-9.
41. Kossatz S, Dalanhol AP, Cunha T, Loguercio A, Reis A. Effect of light activation on tooth sensitivity after in-office bleaching. *Oper Dent*. 2011 May-Jun;36(3):251-7.
42. Arends J, Jongebloed WL, Goldberg M, Schuthof J. Interaction of urea and human enamel. *Caries Res*. 1984 18(1):17-24.
43. Hegedus C, Bistey T, Flora-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent*. 1999 Sep;27(7):509-15.
44. Cavalli V, Arrais CA, Giannini M, Ambrosano GM. High-concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *J Oral Rehabil*. 2004 Feb;31(2):155-9.
45. Kim YS, Kwon HK, Kim BI. Effect of nano-carbonate apatite to prevent re-stain after dental bleaching in vitro. *J Dent*. 2011 Sep;39(9):636-42.
46. Joiner A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. *J Dent*. 2007 Dec;35(12):889-96.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

1. O peróxido de hidrogênio 20% com cálcio, na temperatura de 22°C, foi menos efetivo quanto à luminosidade alcançada no esmalte e dentina, diferindo dos agentes clareadores de baixa concentração.
2. Nenhuma diferença estatística entre os agentes clareadores foi observada após três semanas de tratamento na temperatura de 41°C.
3. Não houve diferença estatística entre as temperaturas avaliadas.
4. Foram observadas alterações morfológicas na superfície de esmalte após o uso dos agentes clareadores, sendo que as maiores alterações ocorreram nos grupos tratados com géis com pH ácido e maior concentração de peróxido de hidrogênio.

REFERÊNCIAS*

Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. Clin Oral Investig. 2010; 14(1): 1-10.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Int. 1989; 20(3): 173-176.

Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching: how safe is it? Quintessence Int. 1991; 22(7): 515-523.

Justino LM, Tames DR, Demarco FF. In situ and in vitro effects of bleaching with carbamide peroxide on human enamel. Oper Dent. 2004; 29(2): 219-25.

Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, *et al.* Effects of two in-office bleaching agents with different pH on the structure of human enamel: an in situ and in vitro study. Oper Dent. 2013; 38(1): 100-10.

Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, *et al.* Light augments tooth whitening with peroxide. J Am Dent Assoc. 2003; 134(2): 167-75.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Group de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

APÊNDICE

METODOLOGIA ILUSTRADA

Foram utilizados 5 agentes clareadores: peróxido de carbamida 10 % (Whiteness Perfect 10 % - FGM), peróxido de hidrogênio 6% (White Class – FGM), peróxido de hidrogênio 20% (Whiteness HP Blue – FGM), peróxido de hidrogênio 35 % (Whiteness HP Maxx - FGM) e peróxido de hidrogênio 35 % (Whiteness HP Blue – FGM) (Figura 1).



Figura 1. Agentes clareadores

As amostras foram divididas em 10 grupos (n=5), de acordo com o agente clareador e a temperatura utilizada (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos de estudo

GRUPOS	AGENTE CLAREADOR	TEMPERATURA
Grupo 1	Peróxido de carbamida a 10% Whiteness perfect	22°C
Grupo 2	Peróxido de carbamida a 10% Whiteness perfect	41°C
Grupo 3	Peróxido de hidrogênio a 6% WhiteClass	22°C
Grupo 4	Peróxido de hidrogênio a 6% WhiteClass	41°C
Grupo 5	Peróxido de hidrogênio a 20% Whiteness HP Blue	22°C
Grupo 6	Peróxido de hidrogênio a 20% Whiteness HP Blue	41°C
Grupo 7	Peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Blue	22°C
Grupo 8	Peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Blue	41°C
Grupo 9	Peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Maxx	22°C
Grupo 10	Peróxido de hidrogênio a 35% Whiteness HP Maxx	41°C

1. PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram utilizados 50 incisivos bovinos, armazenados em soro fisiológico. Após a coleta e desinfecção (timol 0,1%), os dentes foram submetidos à raspagem manual com cureta periodontal para remoção de debris orgânicos e, depois, examinados sob lupa com aumento de quatro vezes para verificar eventual presença de trincas ou algum manchamento, que eventualmente poderiam influenciar nos resultados deste estudo. Em seguida, esses dentes foram armazenados em água destilada, sob refrigeração, até o momento da sua utilização.

Após a seleção dos dentes, a coroa do dente foi separada da raiz com uso de disco dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montado em peça de mão, sob constante

refrigeração com água (Figura 2). Os blocos foram obtidos através de cortes com disco diamantado acoplado em cortadeira de precisão. Foram realizados dois cortes, nos sentidos méso-distal e cérvico-incisal, obtendo-se assim 1 bloco de cada dente (Figura 3). Assim, foram obtidos blocos das superfícies vestibulares dos dentes com 5 mm de comprimento e 5 mm de largura.

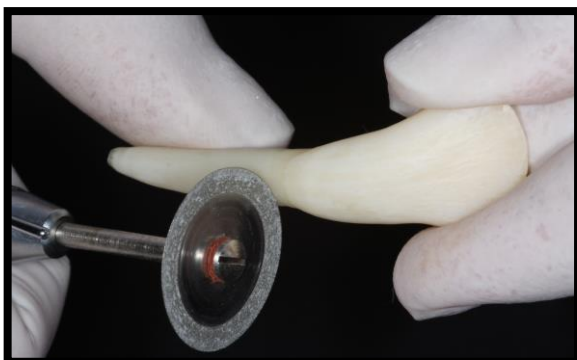


Figura 2. Separação da coroa dental da raiz



Figura 3. Obtenção dos fragmentos

Após esta secção, o esmalte de cada bloco foi planificado com lixa de granulação #600 e #1200 em politriz com constante irrigação com água, até atingir a espessura de 1 mm. Da mesma forma, a superfície de dentina também foi abrasionada (Figura 4), obtendo-se a espessura total padronizada de 3,5 mm do fragmento (1 mm de esmalte e 2,5 mm de dentina) (Figura 5). Cada espécime recebeu uma marcação com broca esférica nº 1012 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em uma das faces laterais com a finalidade de padronizar o posicionamento da amostra durante a leitura com o espectrofotômetro.

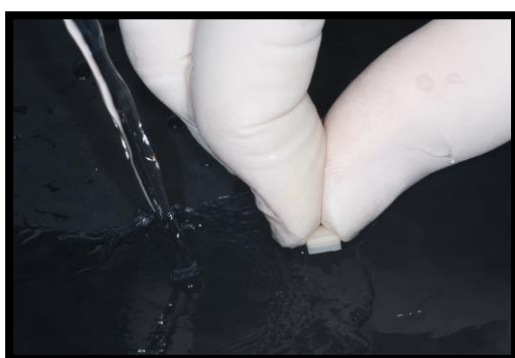


Figura 4. Planificação do esmalte e dentina



Figura 5. Fragmentos padronizados

2. PROTOCOLO DE MANCHAMENTO DENTAL

Os fragmentos foram submersos em solução de chá preto durante 6 dias, em

temperatura ambiente, para pigmentação das superfícies de esmalte e dentina. Esta solução foi obtida por meio imersão de 1,6g de chá preto (Chá Preto Leão, Brasil) em 100ml de água fervida por 5 minutos. Esta solução foi renovada e trocada a cada 24 horas. Após este ciclo de pigmentação, as amostras foram armazenadas em saliva artificial, trocada diariamente, durante 15 dias para a estabilização da cor. Antes da leitura inicial da cor, todas as superfícies das amostras foram limpas (Figs 6 e 7) com pasta de pedra pomes em água (proporção 2:1), com taça de borracha montada em contra ângulo por um único operador, para a remoção da pigmentação extrínseca.



Figura 6. Amostra pigmentada



Figura 7. Remoção da borra de chá da superfície de esmalte

3. ANÁLISE INICIAL DA COR

Para a leitura de cor das superfícies de esmalte e dentina, as amostras foram posicionadas em um porta amostras de teflon (Fig 8) para padronizar o posicionamento em cada avaliação. Para padronizar a luz ambiente, todo o aparato (espectrofotômetro e porta amostra com a amostra a ser avaliada) foi levado para o interior de uma cabine de luz (GTI Mini Matcher MM1e, GTI Graphic Technology Inc., Newburgh, NY, USA) , sendo utilizada a opção “luz do dia” para todas as leituras (Figs 9 e 10). Os dados foram lidos usando o programa On Color QC Lite (Konica Minolta, Japão) em computador.

Os valores obtidos eram quantificados nas 3 coordenadas do Sistema CIELab (L, a, b) as quais definem numericamente a cor de um objeto dentro de um espaço tridimensional de cores através de software específico (On Color, Konica Minolta, Japão).

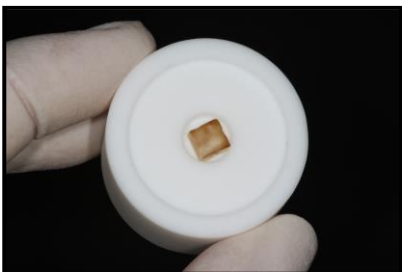


Figura 8. Porta amostra



Figura 9. Cabine de luz



Figura 10. Espectrofotômetro

4. PROTOCOLO DE CLAREAMENTO DENTAL

Aproximadamente 1ml de agente clareador foi depositado em um “ependorf” e resfriado a 22°C, por imersão em água resfriada ou aquecido a 41°C (Fig 11) por meio de uma estufa digital (Fig 12) (Dry Incubator, Astory, Itália). A temperatura do gel foi aferida com uso de termômetro digital (Fig 13) (Digital Thermometer TH-1300, Instrutherm Instrumentos de medição limitada, SP, Brasil), antes do início do tratamento.

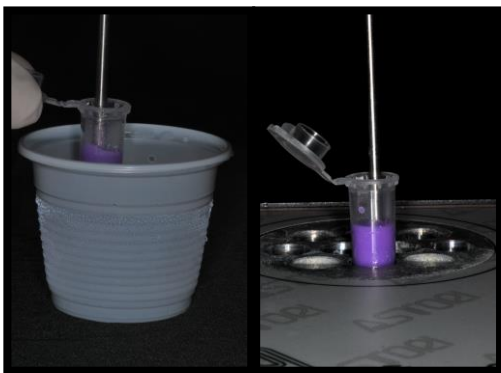


Figura 11. Resfriamento e aquecimento do gel



Figura 12. Estufa digital



Figura 13. Termômetro digital tipo K

Para o clareamento, os fragmentos dentais foram fixados em uma placa de vidro, por uma fita adesiva dupla-face, e uma camada homogênea de agente clareador (aproximadamente 1mm de espessura) foi aplicado na superfície de esmalte. Os tratamentos clareadores foram aplicados de acordo com as instruções do fabricante, seguindo os seguintes protocolos:

- **Grupo 1 (22°C) e 2 (41°C): Peróxido de Carbamida 10% (Whiteness Perfect – FGM, SC, Brasil)**

O gel clareador foi depositado no esmalte e permaneceu em contato com esta superfície por 4h, segundo recomendações do fabricante. As amostras foram inseridas em aparato (Fig 14) contendo água para evitar desidratação, no entanto sem contato com a superfície contendo gel. Este aparato foi tampado e levado para a estufa a 37°C durante as 4h, para simular as condições de umidade e temperatura da cavidade oral. Após este tempo, as amostras foram completamente lavadas com água corrente e armazenadas em saliva artificial (Fig 16) até a próxima sessão clareadora. As sessões de clareamento foram realizadas diariamente, durante um período de 21 dias.



Figura 14. Aparato com água



Figura 15. Amostras em estufa à 37°C



Figura 16. Amostra armazenada em saliva artificial

- **Grupo 3 (22°C) e Grupo 4 (41°C):): Peróxido de Hidrogênio 6% (WhiteClass – FGM, SC, Brasil)**

O gel foi aplicado na superfície de esmalte da amostra e permaneceu em contato com a mesma por 1h30min, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram inseridas em um aparato contendo água para não ocorrer desidratação, porém sem contato com a superfície que contém o gel, e o conjunto foi levado à estufa ($37^{\circ}\text{C} \pm 2$) para simular as condições de umidade da cavidade bucal. Após cada aplicação, as amostras foram lavadas abundantemente em água corrente, secadas com papel absorvente e, em seguida, armazenadas em saliva artificial a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$. Foi realizada uma sessão de tratamento clareador por dia, durante 21 dias.

- **Grupo 5 (22°C) e Grupo 6 (41°C):): Peróxido de Hidrogênio 20% (Whiteness HP Blue – FGM, SC, Brasil)**

As amostras foram submetidas a 3 sessões tratamento clareador. Cada sessão consistiu em uma aplicação de gel clareador com intervalo de 7 dias entre as mesmas. Nesta aplicação, o gel permaneceu em contato com o esmalte da amostra por 50 minutos. Após a aplicação, as amostras foram lavadas abundantemente em água corrente e armazenadas em saliva artificial a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$.

- **Grupo 7 (22°C) e Grupo 8 (41°C):): Peróxido de Hidrogênio 35% (Whiteness HP Blue – FGM, SC, Brasil)**

As amostras foram submetidas a 3 sessões tratamento clareador. Cada sessão consistiu em uma aplicação de gel clareador. Nesta aplicação, o gel permaneceu na superfície de esmalte (Fig 17) da amostra por 40 minutos, conforme a recomendação do fabricante. Após a aplicação, as amostras foram lavadas abundantemente em água corrente e armazenadas em saliva artificial a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$.

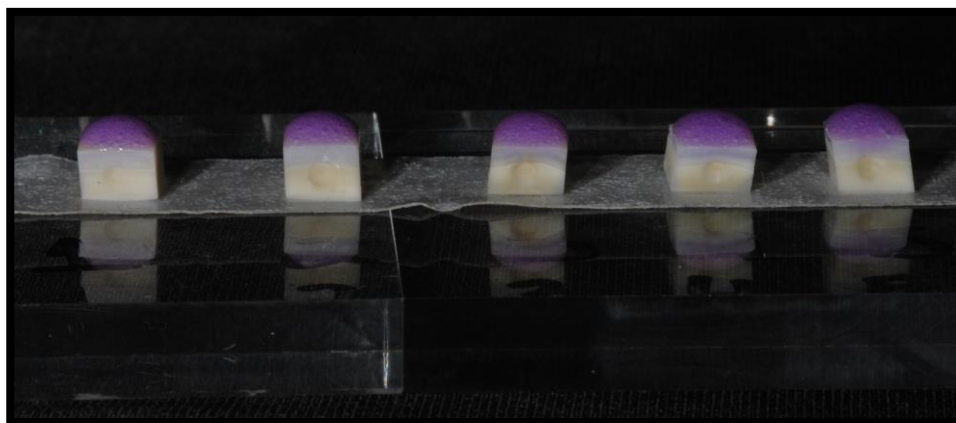


Figura 17. Amostras com gel de alta concentração

- **Grupo 9 (22°C) e Grupo 10 (41°C):): Peróxido de Hidrogênio 35% (Whiteness HP Maxx – FGM, SC, Brasil)**

Foram realizadas 3 sessões de tratamento com intervalo de 7 dias entre cada sessão. Cada sessão consistiu de 3 aplicações do gel. Para cada aplicação o gel foi aquecido ou resfriado, de acordo com cada grupo, e permaneceu na superfície de esmalte da amostra por 15 minutos, conforme a recomendação do fabricante. Após as aplicações, as amostras foram lavadas abundantemente em água corrente e armazenadas em saliva artificial a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$.

6. ANÁLISE DE COR APÓS O CLAREAMENTO

Ao final de cada semana de clareamento, aguardava-se 24h para reidratação das amostras em saliva artificial, antes da realização da leitura de cor. Todos os grupos foram avaliados durante 3 semanas.

7. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a análise morfológica da superfície de esmalte por meio de MEV, 33 fragmentos dentais bovinos foram obtidos e abrasionados da mesma maneira descrita anteriormente. Estes fragmentos foram polidos em feltros (TOP, RAM e SUPRA – Arotec, Cotia, SP, Brasil) com pastas diamantadas com granulações decrescentes (6 μm , 3 μm e 1 μm - Arotec, Cotia, SP, Brasil) diluídas em óleo lubrificante (Arotec, Cotia, SP, Brasil) (Figura 18) montados em politriz, para obtenção de uma superfície de esmalte extremamente lisa. Cada amostra foi polida por 30 segundos, em cada um dos feltros com sua pasta correspondente, e no intervalo entre um e outro, elas foram submetidas a um banho em água destilada em cuba ultrassônica (T7, Modelo CT , Thorntont-Inpec Eletrônica Ltda, Vinhedo, SP, Brazil).



Figura 18. Feltros, pasta diamantada e óleo lubrificante

As amostras foram divididas aleatoriamente em 11 grupos ($n=3$), sendo realizado os mesmo protocolos clareadores já descritos anteriormente (10 grupos), e um grupo (controle), permaneceu em saliva artificial, trocada diariamente, durante as 3 semanas de tratamento. Então, as amostras foram desidratadas por imersão em soluções crescentes de álcool e metalizadas com liga de ouro (Figura 19) para posterior observação em MEV (Figura 20).

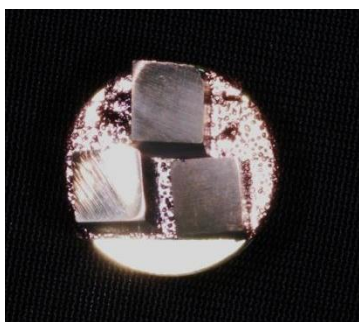


Figura 19. Amostras metalizadas



Figura 20. JEOL JSM-5600 LV (Tóquio, Japão)